

明 細 書

毛乳頭細胞調製品の調製方法、毛包を再生するための組成物、方法及び再生された毛包を担持する動物

技術分野

本発明は活性毛乳頭細胞を含有し、且つ含有する上皮系細胞が不活化された毛乳頭細胞調製品を調製する方法、毛包を再生するための毛乳頭細胞及び上皮系細胞を含有する組成物、それを用いて毛包を再生する方法、さらにはそのような方法により再生された毛包を担持する動物又は３次元皮膚モデルを提供する。

背景技術

毛包は成熟した生体で自己再生をほぼ一生涯を通じて繰り返す例外的な器官である。その自己再生の仕組みを解明することは、組織や細胞移植による脱毛治療、毛包や皮脂腺を含有する自然に近い機能的にも優れた皮膚シートの構築など、ニーズの高い臨床応用に繋がるものと期待される。近年、幹細胞研究への関心の高まりと共に毛包上皮幹細胞（上皮細胞）の研究が急速に進展し、また毛包特異的な間葉系細胞たる毛乳頭細胞についてもその性質が少しずつ判ってきた。毛乳頭細胞は毛包の自己再生のために毛包上皮幹細胞に活性化シグナルを送るいわば司令塔の役割を担い、毛包再構成評価系においては毛包上皮幹細胞と共に欠くことのできない細胞であることが判っている（Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), Vol. 96, pp. 7336-7341）。

毛包の再生を目指して、動物モデルでの毛包再構成実験がこれまで様々な方法で行われている。Weinberg et al., J. Invest. Derm

atol. (1993), Vol.100, pp. 229-236には細胞移植法による毛包再構成方法が記載されている。Weinbergらの移植系は毛乳頭細胞、新生仔上皮系細胞（毛包上皮幹細胞を含む）のほかにマウス3T3細胞の加えられて複雑な構成を有する。Weinbergらの方法によれば毛包上皮幹細胞を含む新生仔上皮系細胞を移植系に加えなくても毛包が再生することである。しかしながら、これは毛乳頭細胞画分から未分化上皮系細胞（毛包上皮幹細胞）や毛包原基を完全に除去することが困難なために起きた現象であると考えられる。その後、Kishimotoら（前掲）は毛乳頭細胞の単離精製にはじめて成功し、単離精製した毛乳頭細胞を用い、動物モデルでの細胞移植法による毛包再構成実験を行った結果、毛乳頭細胞と上皮細胞との組み合わせを含む細胞画分を移植すると毛包が再構成され、発毛が認められるが、毛乳頭細胞又は上皮細胞のいずれかしか含まない細胞画分を移植した場合、発毛が認められないことを見出している。

しかしながら、Kishimotoらによる毛乳頭細胞の精製方法は、毛乳頭細胞がバーシカン（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン類）を特異的に発現する性質を有することを利用し、バーシカン遺伝子にリポーター遺伝子を繋げたDNAを用いて作製したトランスジェニックマウスモデルによってバーシカン発現を指標とし、単離・濃縮を行うものである。従って、この方法はトランスジェニックマウスの作製、セルソーターによる毛乳頭細胞の純化を要する。特に、毛包再構成方法において毛包を実際に再生させ、発毛を起こさせるには大量の毛乳頭細胞が必要であり（例えば、1移植当たり500万個の細胞）、そのためこの方法では大量のトランスジェニックマウスの作製、長時間の高速セルソーターの使用を要し、経済的にも、また作業時間、労力の面においても問題があった。毛乳頭細胞の単離は例えばProuty et al., American J. Pathol. (1996) Vol.14

8, No. 6, pp. 1871-1885も記載されているが、遠心分離により分画を繰り返す複雑で、純度が低く且つ収量の低い方法である。

従って、これまでの毛乳頭細胞精製法では単離精製された活性毛乳頭細胞を、例えば移植のために十分な量で獲得することが困難であり、毛包再生系における活性毛乳頭細胞の役割を完全に解明することができなかった。特に、毛包を再生する毛包再構成系における毛乳頭細胞と上皮系細胞の適切な割合を決定することは、従来技術による精製法では事実上不可能であった。

発明の開示

本発明の課題は、トランスジェニックマウスを使用せず、簡単に、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供することにある。

本発明者は、驚くべきことに、皮膚組織から採取した真皮組織画分の細胞懸濁物を凍結保存すると、その懸濁物中に夾雑した毛包上皮細胞が特異的に死滅し、毛乳頭細胞は大半が活性であり続けることを見出した。その結果、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する細胞調製品を得ることができた。また、このようにして得た細胞調製品は活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有するため、毛包を再生するのに有効な毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の割合を決定するのに利用できる。その結果、本発明者は毛包の再生に最適とされる毛包再構成系における毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の割合を決定することもできた。

従って、第一の観点において、本発明は毛乳頭細胞調製品を調製する方法であって、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛包上皮細胞を死滅させることを

特徴とする方法を提供する。

上記細胞懸濁物の細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$ に調整してから凍結保存を行うことが好ましい。更に好ましくは、上記凍結保存は -80°C 以下の温度で、例えば液体窒素の中で、好ましくは1週間以上の期間にわたって行う。

好適な態様において、上記皮膚組織がマウス、ラット又はヒトに由来するものであってよい。

別の観点において、本発明は、毛乳頭細胞及び上皮系細胞を含んで成り、当該毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比が $1 : 10 \sim 10 : 1$ であることを特徴とする毛包を再生するための組成物を提供する。

更に好ましくは、本発明は、毛乳頭細胞及び上皮系細胞を含んで成る毛包を再生するための組成物であって、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛包上皮細胞を死滅させることで調製された毛乳頭細胞調製品及び上皮系細胞を含んで成り、ここで当該毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比が $1 : 10 \sim 10 : 1$ である、毛包を再生するための組成物を提供する。

好ましくは、上記毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比は $1 : 3 \sim 10 : 1$ 、更に好ましくは $1 : 1 \sim 10 : 1$ 、更により好ましくは $1 : 1 \sim 3 : 1$ 、最も好ましくは $1 : 1$ である。

本発明は更に、上記組成物を用いて動物又は3次元皮膚モデルに毛包を再生する方法、及びこのようにして毛包の再生された動物又は3次元皮膚モデルを提供する。

本発明により、トランスジェニックマウスを使用せず、簡単に、活性細胞成分として毛乳頭細胞のみを含有する毛乳頭細胞調製品を

調製する方法が提供された。この毛乳頭細胞調製品は毛包再生のための移植手術や、毛包再構成の研究・開発に利用できる。特に、当該毛乳頭細胞調製品には活性上皮幹細胞の夾雑がないため、毛包の再生に使用する活性毛乳頭細胞と活性上皮毛幹細胞の細胞数の割合を精密に調整することが必要であり、しかも細胞を大量に必要とする状況において、有利である。

図面の簡単な説明

図 1 は、LacZ 及び 7-AAD に基づく凍結融解真皮細胞画分の F A C S 解析結果を示す。

図 2 は、CD-49 及び 7-AAD に基づく凍結融解真皮細胞画分の F A C S 解析結果を示す。

図 3 は、凍結融解毛乳頭細胞と上皮系細胞の混合移植による毛包再生結果を示す。

図 4 は、毛乳頭細胞と上皮系細胞とを異種系（マウスメッシュ）にした場合の毛包再構成結果を示す。

図 5 は、毛乳頭細胞と上皮系細胞とを異種系（ラット→ヒト）にした場合の毛包再構成のヘキスト核染色結果を示す。

図 6 は、本発明の毛包再生系を 3 次元皮膚モデルに移植した場合の毛包原基形成を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は毛乳頭細胞調製品を調製する方法を提供する。

本発明はまた、毛包を再生するための毛乳頭細胞及び上皮系細胞を含有する組成物、それを用いて毛包を再生する方法、さらにはそのような再生された毛包を担持する動物又は 3 次元皮膚モデルを提供する。

「毛乳頭細胞」とは、間葉系細胞として毛包最底部に位置し、毛包の自己再生のために毛包上皮幹細胞に活性化シグナルを送る、いわば司令塔の役割を担っている細胞をいう。活性化毛乳頭細胞のみを含有する毛乳頭細胞調製品は、例えばトランスジェニックマウスを使用したKishimoto（前掲）の方法に調製できる。しかしながら、収量などの点で好ましくは、例えば皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛包上皮細胞を死滅させることで調製することができる。

本発明に係る上記凍結保存による方法は、具体的には、例えば以下の通りにして実施できる。

1. 哺乳動物の表皮を用意する。
2. この表皮を、必要ならタンパク質分解酵素溶液、例えばトリプシン溶液の中に適当な時間、例えば一晚静置し、その後表皮部分をピンセットなどで取り除き、残った真皮をコラゲナーゼで処理し、細胞懸濁液を調製する。
3. 必要ならセルストレーナーにより懸濁液をろ過し、静置により沈殿物を除去する。
4. 細胞数を計測し、適当な細胞密度、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$ 程度の細胞密度にて凍結保護液で再懸濁し、必要なら小分け分注し、通常の細胞保存方法に従い、凍結保存する。
5. 適当な期間保存後、融解し、使用する。

凍結方法は特に限定されることはないが、 -20°C 以下、好ましくは -50°C 以下、より好ましくは -80°C 以下の超低温冷凍庫中で、又は液体窒素中で保存する。凍結保存期間も特に限定されることがないが、上皮細胞が死滅するよう、例えば1日以上、好ましくは3日以上、より好ましくは1週間以上の期間とする。尚、液体窒

素中で4ヶ月保存しても、毛乳頭細胞は生存し続けていることが確認された。凍結保護液としては細胞の保存において使用されている通常の保存液、例えばセルバンカー2細胞凍結保存液（カタログNo. BLC-2）（日本全薬工業製）が使用できる。

細胞数の計測は当業者周知の方法により実施することができる。例えば、細胞数の計測は血球計算盤（SLGC社製、EOSINOPHIL COUNTER）に等量の0.4%トリパンブルー染色液（No.15250-061、インビトロジェン）で希釈した細胞懸濁液を供して血球計算盤付属の取扱説明書記載の方法に従って算出することができる。

本発明において使用する毛乳頭細胞の起源となる哺乳動物の表皮はあらゆる哺乳動物に由来してよく、限定することなく、例えばヒト、チンパンジー、その他の霊長類、家畜動物、例えばイヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、他に実験用動物、例えばラット、マウス、モルモット、より好ましくはヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットの表皮であってよい。また、動物の系統も限定されることはない。

本発明に係る毛包を再生するための組成物における「上皮系細胞」は、皮膚の表皮または上皮の大部分を構成する細胞であり、真皮に接する1層の基底細胞から生じる。マウスを例にすると、上皮系細胞としては新生仔（もしくは胎児）に由来する上皮系細胞が好ましく使用できるが、成熟した皮膚、例えば休止期毛の表皮又は成長期毛の表皮に由来する細胞でも、ケラチノサイトの形態にある細胞の培養物であってもよい。かような細胞は、当業者周知の方法により所望のドナー動物の皮膚から調製することができる。

好適な態様において、上皮系細胞は以下のとおりにして調製できる。

1. 哺乳動物の表皮を用意する。

2. この表皮を、必要なら0.25%トリプシン/PBS中で4℃下で一晩静置することでトリプシン処理する。

3. ピンセットなどにより表皮部分のみ剥離し、細切後、適当な培養液（例えばケラチノサイト用培養液）中で4℃で約1時間懸濁処理する。

4. この懸濁物を適当なポアサイズを持つセルストレーナーに通し、次いで遠心分離器にかけて上皮系細胞を回収する。

5. この細胞調製品をKGMあるいはSFM培地に所望の細胞密度で懸濁し、使用直前まで氷上に静置しておく。

本発明の上皮系細胞は毛乳頭細胞と同様、あらゆる哺乳動物、例えばヒト、チンパンジー、その他の霊長類、家畜動物、例えばイヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、他に実験用動物、例えばラット、マウス、モルモット、より好ましくはヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットの表皮に由来し得る。また、その表皮部位は有毛部位、例えば頭皮でも、無毛部位、例えば包皮であってもよい。

本発明者は、上記凍結保存により獲得した、活性細胞として毛乳頭細胞のみを含有し、上皮系細胞の死滅した毛乳頭細胞調製品を、毛乳頭細胞の除かれた活性上皮系細胞のみを含有する上皮系細胞調製品と様々な細胞比率で混合し、レシピエント動物に移植して毛包の再生を検討したところ、毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比と毛包の再生との間で一定の関係があることが見出された。即ち、毛包をより多く再生させることが所望される場合、活性毛乳頭細胞、対、活性上皮系細胞の細胞数の比を1:3~10:1、更に好ましくは1:1~10:1、更により好ましくは1:1~3:1、最も好ましくは1:1とすべきことが見出された。換言すれば、活性毛乳頭細胞と活性上皮系細胞の比率を適宜調整してレシピエント

動物に移植すれば、毛包の再生を調整できる。

毛乳頭細胞と上皮系細胞との組み合わせは同種系でも、異種系でもよい。例えば、毛乳頭細胞調製品がマウスに由来する場合、上皮系細胞はマウスに由来するか（同種系）、又はその他の種、例えばラット、ヒトに由来してもよい（異種系）。従って、本発明の毛包を再生するための組成物は、例えば、毛乳頭細胞及び上皮系細胞が共にマウスに由来する組み合わせ、共にラットに由来する組み合わせ、もしくは共にヒトに由来する組み合わせでも（以上、同種）、又は毛乳頭細胞がマウスに由来し、上皮系細胞がラットに由来する組み合わせ、毛乳頭細胞がラットに由来し、上皮系細胞がマウスに由来する組み合わせ、毛乳頭細胞がマウスに由来し、上皮系細胞がヒトに由来する組み合わせ、毛乳頭細胞がラットに由来し、上皮系細胞がヒトに由来する組み合わせ、毛乳頭細胞がヒトに由来し、上皮系細胞がマウスに由来する組み合わせ、毛乳頭細胞がヒトに由来し、上皮系細胞がラットに由来する組み合わせ（以上、異種）、等であってよい。

本発明に係る毛包の再生のための組成物をレシピエント動物に移殖する方法は、それ自体公知の移殖方法によることができる。例えば、Weinberg et al, J. Invest. Dermatol. Vol.100(1993), pp.229-236を参照のこと。例えばヌードマウスに移植を行う場合、用意された細胞を移植直前～1時間前に混合し、遠心（ $9000 \times g$, 10 min.）により培養液を取り除き、50～100 μL 程度の細胞塊にした後、すみやかにヌードマウス背部皮膚に埋め込んだシリコン製のドーム型チャンバー内に流し込む。1週間後にチャンバーを注意深く取りはずし、さらに2週間目以降に移植部位の毛髪形成の有無の肉眼観察を行うことができる。ヒトを含む動物に発毛を目的に移植を行う場合も似たようにして行うことができ、適切な方

法は医師や獣医により適宜決定されるであろう。

移植は、例えば直径約 1 cm の円に対し、毛乳頭細胞が $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個 / cm^2 、好ましくは $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個 / cm^2 の移植量、より好ましくは 1.27×10^7 個 / cm^2 の移植量で移植されるように行うのが好ましい。

上記組成物をレシピエント動物に移植する場合、その移植は同種移植、即ち自己移植、同種同系移植もしくは同種異系移植であっても、異種移植であってもよい。同種移植の場合、毛乳頭細胞調製品及び上皮系細胞は共にレシピエントと同種である。異種移植では、毛乳頭細胞調製品又は上皮系細胞のいずれか一方がレシピエントと異種であり、他方がレシピエントと同種である場合と、双方がレシピエントと異種の場合がある。レシピエント動物としてはあらゆる哺乳動物、例えばヒト、チンパンジー、その他の霊長類、家畜動物、例えばイヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、他に実験用動物、例えばラット、マウス、モルモット、より好ましくはヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットが挙げられる。

また、本発明に係る上記組成物を適当なレシピエント動物に移植することで、再生毛包を担持するキメラ動物を提供することができる。かかるキメラ動物は、例えば毛包の再生の機構を研究・解明するため、あるいは毛包再生又は発毛もしくは脱毛に有効な薬剤・生薬のスクリーニングを行うための有力な動物モデルを担うことができるであろう。レシピエント動物は、該動物に移植される系に含まれる各細胞の起源に拘わりなく、免疫系が抑制された動物であることが好ましい。また動物種としては、実験動物として使用しうるものであり、本発明の目的に沿うものである限り、いかなる動物であってもよいが、好ましくは、マウス、ラット等を挙げることができる。このような動物のうち、免疫系が抑制されているものとしては

、マウスを例にすれば、ヌードマウスのように、胸腺欠損のごとき形質をもつものが挙げられる。なお、本発明の目的を考慮すれば、特に好ましいレシピエント動物としては、市販のヌードマウス（例えば、B a l b - c n u / n u 系統）、スキッドマウス（例えば、B a l b / c - S C I D）、ヌードラット（例えば、F 3 4 4 / N J c l - r n u）を挙げることができる。

更に、本発明に係る組成物を三次元皮膚モデルに含包させることで、再生毛包を担持する三次元皮膚モデルを提供することができる。三次元皮膚モデルは当業者周知の方法（Exp. Cell Res. Amano S. et al., (2001), Vol. 271, pp. 249-262）により、例えば下記のようにして作製することができる。三次元皮膚モデルは毛乳頭細胞を $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個 / cm^2 、好ましくは $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個 / cm^2 、より好ましくは約 1.27×10^7 個 / cm^2 の量で含む。

三次元皮膚モデル作製方法

ヒト線維芽細胞を 0.1% コラーゲン溶液 / DMEM / 10% FBS に適当量分散させ、シャーレに分注し、ただちに 37℃ の CO_2 インキュベータに静置する。ゲル化後、シャーレ壁面および底面よりゲルを剥がし、シャーレの中で浮遊するようにさせる。コラーゲンゲルを揺らせながら培養し、ゲルを約 5 分の 1 に収縮させ真皮モデルとする。真皮モデルをステンレスグリッドの上に置き、その上にガラスリングをセットし、KGM（表皮細胞培養用培地）に分散したヒト培養表皮細胞（ 1.0×10^6 細胞数 / ml）を 0.4 ml、ガラスリング内に注入し、培養する。このとき、毛乳頭細胞画分を同時に混合して注入する。ヒト培養表皮細胞の代替としてマウス新生児表皮細胞を用いることもできる。シャーレ内に DMEM - KGM - 5% FBS + Ca^{2+} の培地を、真皮モデルの上部が空気に晒

される程度に入れ、培養し、約一週間後に皮膚モデルを観察し、毛包原基形成の有無と再現性を判定する。

再構成毛包を担持した3次元皮膚モデルは、上記再生毛包を担持するキメラ動物と同様、毛包の再生の機構を研究・解明や発毛・脱毛に有効な薬剤・生薬のスクリーニングに利用できる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

真皮細胞画分の凍結保存により、上皮細胞が死滅し、活性細胞として毛乳頭細胞のみを含有する細胞調製品が得られることを確認するため、バーシカン (V e r s i c a n) プロモーター下流にマーカートンパク、L a c Z、の構造遺伝子をつないだ発現ベクターを導入したトランスジェニックマウス（以下「バーシカン-LacZ TGマウス」）より採取した皮膚組織より得られた細胞画分を凍結保存し、融解した細胞調製品についてフローサイトメトリー解析した。

(1) バーシカン-LacZ TGマウスの真皮細胞からの「凍結保存」毛乳頭細胞調製品の調製

(1-1) バーシカン-LacZ TGマウスから生まれた新生仔（生後4日以内に使用）のうち、L a c Z 陽性の個体を選別した。バーシカン-LacZ TGマウスは、例えばKishimotoら（前掲）に記載の方法により作製することができる。

(1-2) 各個体をエタノールとリン酸緩衝生理食塩水（以下「P B S」）で洗浄後、背部皮膚を剥離し、0.25%トリプシン/P B S 中で4℃下で一晩静置した。

(1-3) 翌日、ピンセットなどにより表皮と真皮を分離し、真皮側を0.35%コラゲナーゼ/D M E M（ダルベッコ変法イーグル最少培地。以下「D M E M」）により37℃下で約1時間ほど処

理した。

(1-4) (1-3) の細胞を念入りに懸濁操作を行ったのち、セルストレーナーに通し、次いで遠心分離器 (900 g、10分) によって細胞を集めた。

(1-5) 細胞数を計測し、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$ の細胞密度にて細胞凍結保護液 (セルバンカー 2 (BLC-2)、日本全薬工業製) で再懸濁し、凍結チューブに分注、通常の細胞保存方法に従い、液体窒素内で保存した。

(1-6) 約1週間後に融解し、これを以下のフローサイトメトリー解析に用いた。

(2) フルオロレポーター LacZフローサイトメトリー解析
実験材料

・フルオロレポーター LacZフローサイトメトリーキット (FluoroReporter lacZ flow cytometry kits) Molecular Probe社、カタログ No. F-1930 (50反応分) / F-1931 (250反応分)

・試薬の準備:

反応液: キット中のFDG試薬 (Component A) をMiliQ水で1:10に希釈した。1サンプル当たり50 μL を使用した。

停止液: キット中のPI試薬 (Component D) をキット付属の緩衝液で1:100に希釈した。1サンプル当たり0.9mlを使用した。使用するまで氷中において4℃に冷やしておいた。染色媒体としては、上皮細胞を特異的に染色する特異的抗体であるCD49 f モノクローナル抗体 (セロテック社製、MCA699)、死細胞を特異的に染色する7-ADD (ベックマンコールター製、PN-IM 3422) を用いた。

(2-1) バーシカン-LacZ TGマウス由来の真皮細胞の懸濁液を $\sim 1 \times 10^7$ 細胞数までの細胞数に調整して、750 μl の染色媒体を加えて、1.5mlのエッペンチューブに移した。

(2-2) 3000回転で5分間遠心し、上澄みを捨てた。細胞ペレットを100 μ Lの染色媒体に再懸濁した。この懸濁物を37℃の恒温槽で10分間ブレインキュベーションした。

(2-3) 37℃の恒温槽で10分間ブレインキュベーションしておいた反応液を50 μ L加えて、正確に1分間、37℃で反応を行った。

(2-4) 0.9mlの停止液を加え、氷中に保存した。

(2-5) 10分後に40 μ Lの50mM PETG (Component B)を加えて反応を完全に阻害した。

(2-6) すみやかにFACSで蛍光強度を測定した。フローサイトメーター (FACS) の操作方法是メーカーの取扱説明書によった。FACSの測定装置は例えば、ベックマン・コールター社のXL-MCLを用いることができる。本キットに使用されている蛍光色素Fluorescein (フルオロセイン) に適した検出設定で細胞の蛍光強度の分布を測定した。

(3) 解析結果

LacZ及び7-AADに基づくFACS解析は、凍結融解した細胞中のLacZ⁺細胞の大半が、凍結融解を経ても生細胞であることを示した(図1)。従って、毛乳頭細胞は凍結融解によって死滅しないことが明らかとなった。また、CD-49及び7-AADに基づくFACS解析では、CD-49⁺細胞(上皮系細胞)の大半が凍結融解後、7-AAD⁺画分(死画分)に存在することが示された(図2)。従って、凍結融解した細胞調製品中の生細胞はLacZ⁺、CD-49⁻、7-AAD⁻、即ち、毛乳頭細胞(LacZ⁺)且つ非上皮系細胞(CD-49⁻)であり、しかも生細胞(7-AAD⁻)である。以上の結果をまとめると、生細胞は大半が上皮系細胞ではなく、毛乳頭細胞であることが明らかとなった。よって、凍結融解により上皮系細胞を特異的に死滅させることができ、活性細胞とし

て毛乳頭細胞のみ含む毛乳頭細胞調製品を調製できることが明らかとなった。

実施例 2

凍結融解毛乳頭細胞と上皮系細胞の混合移植により毛包再生を試みた。

I. 各種細胞の調製

(1) マウス由来上皮細胞

(1-1) 手術前日、ICR系統マウスの新生仔より各個体をエタノールとリン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」）で洗浄後、背部皮膚を剥離し、0.25%トリプシン/PBS中で4℃下で一晩静置することで皮膚をトリプシン処理した。

(1-2) ピンセットにより表皮部分のみ剥離し、細切後、ケラチノサイト用培養液（以下「KGM」）中で4℃で約1時間懸濁処理した。

(1-3) セルストレーナーに通した(1-2)の懸濁物を遠心分離器（×900g、10分）にかけて上皮系細胞を回収した。

(1-4) レシピエント動物1個体あたり、2匹の新生仔由来に相当する量の上皮系細胞（細胞数として約 1×10^7 ）を手術に用いた。相当量の細胞をKGMあるいはSFM培地で懸濁して、使用直前まで氷上に静置した。これを「マウス由来上皮細胞」調製品とする。

(2) 「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品（比較例）の調製

(2-1) 手術前日、ICR系統マウスの新生仔より上記(1-1)、(1-2)と同様の方法により皮膚をトリプシン処理した。

(2-2) ピンセットにより表皮部分を剥離し、残った真皮を細切後、0.35%のコラゲナーゼを含んだ適当な培養液DMEM+10%PBS中で37℃で約1時間懸濁処理した。

(2-3) セルストレーナーに通した懸濁物(2-2)を遠心分離器にかけて真皮細胞を回収した。

(2-4) レシピエント動物1個体あたり、細胞数として約 1×10^7 の真皮細胞を手術に用いた。相当量の細胞をDMEM+10%FBSなどで懸濁して、使用直前まで氷上に静置した。これを「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品とする。

(3) 毛乳頭細胞画分を含む「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品の調製

(3-1) 新生仔ICR系統マウス背部皮膚を剥離し、表皮を採取した。

(3-2) トリプシン溶液で一晩静置し、翌日表皮をピンセットで取り除き、残った真皮をコラゲナーゼで処理、細胞懸濁液を調製した。

(3-3) セルストレーナーにより上記懸濁物をろ過し、そして静置により沈殿物を除去した。

(3-4) 細胞数を計測し、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8/\text{ml}$ の細胞密度に凍結保護液で再懸濁し、凍結チューブに分注、通常の細胞保存方法に従い、液体窒素内で保存した。

(3-5) 約1週間後に融解し、移植実験に 1×10^7 個/移植を用いた。これを「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品とする。

II. 毛包再構成方法(動物への移植方法)

上記マウス由来上皮細胞調製品(1-4)を「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品(2-4)又は「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品(3-5)と混合した。これらの混合物を以下の「再構成毛包作成手順」の「細胞懸濁液」として用いた。

<再構成毛包作成手順>

用意するもの：

レシピエント動物（B a l b - c n u / u n 系統ヌードマウス。5 週齢以上）、

シリコーン製の直径 1 センチ程度のドーム状キャップ（以下バルブと呼称）、

麻酔薬、

手術用ハサミ、ピンセット、縫合器、

マイクロピペッター

細胞懸濁液（培養液 D M E M + 1 0 % F B S 約 1 5 0 μ l に懸濁）

< 手順 >

(i) ヌードマウスを麻酔した。

(i i) 背部皮膚を直径 1 センチ弱に切り取った。

(i i i) 傷口にバルブを挿入し、縫合器で固定した。

(i v) バルブ内に、細胞懸濁液をピペッターを用いて注入した。

。

(v) そのまま約 1 週間飼育し、バルブをはずした。

(v i) バルブをはずした後、1 ～ 6 週間後（通常は 2 週間後）、かさぶたが取れた跡に、再構成毛包の生育を観察した。

毛包再構成実験の結果を以下の表 1 及び図 3 に示す。「用時調製」マウス由来真皮細胞調製品のみを移植した場合でも毛包再生が認められるのに対し、「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品のみを移植した場合には毛包再生は認められなかった。この結果は、Kishimotoら（前掲）のトランスジェニックマウス由来の真皮細胞画分からセルソーターにより純化した毛乳頭細胞を用いて得られた結果と一致し、「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品には活性細胞成分として毛乳頭細胞のみが含まれていることを実証した。

表 1

毛乳頭細胞画分	上皮系細胞画分	毛包再生	(発毛数 / 移植数)
用時調製 (未凍結)	用時調製	++	(4 / 4)
用時調製 (未凍結)	—	++	(4 / 4)
凍結融解	用時調製	++	(10 / 10)
凍結融解	—	—	(0 / 10)
—	用時調製	—	(0 / 10)

実施例 3

毛乳頭細胞画分と上皮系細胞画分の細胞比率の毛包再構成効率に及ぼす影響

「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品と、実施例 2 記載のマウス由来上皮細胞と同様の処理により調製したラット新生児皮膚由来上皮系細胞とをそれぞれ、0、 1×10^6 、 3.3×10^6 、 1×10^7 の細胞数に調整し、混合し、上述の再構成毛包作成手順によりヌードマウス背部皮膚に移植して毛包再構成の有無を調べた。その結果を以下の表 2 に示す。

表 2

毛乳頭細胞画分と上皮系細胞画分の比率による
毛包再構成効率に及ぼす影響

毛乳頭細胞画分	上皮系細胞画分	毛包再生
0	1.0×10^7	—
1.0×10^6	1.0×10^7	±
3.3×10^6	1.0×10^7	+
1.0×10^7	1.0×10^7	+++
1.0×10^7	3.3×10^6	+++
1.0×10^7	1.0×10^6	++
1.0×10^7	0	—

表 2 の結果から、毛乳頭細胞と上皮系細胞との混合比が 1 : 10 ~ 10 : 1 の範囲において毛包の再生が認められ、1 : 1 ~ 3 : 1、特に 1 : 1 程度の細胞混合物を移植したとき、毛包の再生が顕著

に生ずることがわかった。

実施例 4

上皮系細胞を成熟したマウス皮膚由来とした場合の毛包再構成

成熟したマウス皮膚由来（10週齢以降）の上皮系細胞の調製を、実施例 2 に記載の新生児マウス由来上皮系細胞の調製に準じて行った。成熟マウス皮膚由来の上皮系細胞として、生後10週齢以降のマウスの休止期毛の表皮から調製したもの（休止期毛上皮系細胞含有系）と、休止期毛の皮膚をワックス塗布による除毛処理により機械的刺激し、発毛を促したマウスの表皮から調製したもの（成長期誘導毛上皮系細胞含有系）の二種類を用いた。これら成熟マウス皮膚由来上皮系細胞をそれぞれ「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品と細胞数が 1 : 1 となるように混合し、上述の再構成毛包作成手順によりマウスの背部に移植した。その結果を以下の表 3 に示す。

表 3

毛乳頭細胞画分	上皮系細胞画分	毛包再構成	(原基形成数 ／移植数)
マウス	マウス (新生仔由来培養細胞)	+	(2 / 2)
マウス	マウス (成マウス：休止期)	++	(3 / 3)
マウス	マウス (成マウス：成長期)	++	(3 / 3)

+++…発毛が高密度で認められる

++…発毛が認められる

+…移植組織内で毛包形成が認められる

毛包原基の形成の有無は移植部組織より薄切片を作製し、ヘマトキシリンーエオジン染色などの一般染色後、形態観察により表皮層の陥没と真皮線維芽細胞の表皮陥没部直下における凝集により判定した。

この結果から明らかな通り、休止期毛上皮系細胞含有系、成長期誘導毛上皮系細胞含有系のいずれを移植した場合でも、発毛が認められた。従って、上皮系細胞は新生仔表皮に限らず、成熟表皮、例えば休止期毛又は成長期毛の表皮に由来する場合でも、毛包再生に有効であることがわかった。

実施例 5

毛乳頭細胞と上皮系細胞とを異種系にした場合の毛包再構成

「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品とラット新生児皮膚由来上皮系細胞とをそれぞれ約 1×10^7 個混合し、上述の再構成毛包作成手順によりヌードマウス背部皮膚に移植して毛包再構成の有無を調べた。その結果は以下の表 4 及び図 4 にも示す。

表 4

毛乳頭細胞画分	上皮系細胞画分	毛包再構成	(原基形成数 ／移植数)
マウス	マウス (新生仔)	+++	(12 / 12)
ラット	ラット (新生仔)	+++	(3 / 3)
マウス	ラット (新生仔)	+++	(4 / 4)

+++…発毛が高密度で認められる

++…発毛が認められる

+…移植組織内で毛包形成が認められる

この結果から明らかなとおり、毛乳頭細胞と上皮系細胞との混合物が異種系であっても、同種系と同様、毛包を再生させるのに有効であることがわかった。

実施例 6

上皮系細胞をヒト新生児包皮由来とした場合の毛包再構成

割礼などにより得られたヒト新生児包皮より表皮細胞を調製し、凍結保存マウス毛乳頭細胞調製品と混合し、上述の再構成毛包作成手順によりヌードマウス背部皮膚に移植して毛包再構成の有無を調

べた。

包皮組織は一般的な線維芽細胞培養用培地（DMEM培地など）及び角化細胞培養用培地（ケラチノサイトーSFM培地；インビトロジェンなど）中で冷蔵保存することで、3～1週間程度、保存することができる。

包皮由来培養細胞は下記の方法により調製した。

上記培地中の包皮組織（人種を問わず利用できる）をPBS（組織培養用、カルシウム、マグネシウムフリー）にストレプトマイシン、ペニシリンなどの抗生物質が添加された溶液で満たされたペトリデッシュ中で30分間、反応させた。さらに10分間、新しいPBSと抗生物質で満たされたペトリデッシュに移し、10分間反応させた。過剰の脂肪組織を除去した後に、約1 cm²程度の皮膚片に裁断し、デスパーゼ溶液（合同清酒製：濃度1000 U～5000 U）中に浮遊させた状態で4℃、約18時間反応させた。反応後、再びPBS溶液で洗った後に、表皮部分を慎重にピンセットでつまみ剥がした。剥がした表皮シートを5 mlの0.05%トリプシンー0.5 mM EDTA溶液に懸濁し、37℃で15分間反応させた。

トリプシンインヒビターを加え、反応を停止した後、900回転で10分間遠心し、上澄みを捨てた。10 mlのケラチノサイトーSFM培地（インビトロジェン社製）に再懸濁し、細胞数を計測した。約1 x 10⁶～10⁷個の細胞を一回の移植実験に供した。移植のために、継代した培養表皮細胞を調製する場合は、約1 x 10⁶の表皮細胞をI型ないしはIV型コラーゲン溶液でコートした100 mmのシャーレあるいは75 cm²のフラスコに播種し、ケラチノサイトーSFM培地を用いて、CO₂インキュベータ内で定法に従い培養を行った。細胞がコンフルエントに達した時点で、トリプシンにより細胞を剥がし、回収し、再度1 x 10⁶の細胞密度に調整して、必

要な細胞数、継代数になるまで培養を続けた。

上記移植の結果も以下の表 5 に示す。

表 5

毛乳頭細胞画分	上皮系細胞画分	毛包再構成	(原基形成数 ／移植数)
マウス	ヒト (新生児包皮)	+	(3 / 3)
マウス	ヒト (新生児包皮由来 培養細胞)	+	(2 / 2)

＋…移植組織内で毛包形成が認められる

この結果から、上皮系細胞としてヒト由来のものをマウス毛乳頭細胞と組み合わせても、毛包の再生に有効であることがわかった。また、興味深いことに、包皮細胞は毛包や毛根を有しない皮膚部位由来の上皮系細胞であるにもかかわらず、毛乳頭細胞と組み合わさることで毛包を再生させた。従って、毛包を再生させる系において毛乳頭細胞と組み合わせることができる上皮系細胞は、有毛部位の皮膚に限らず、無毛部位の皮膚に由来してよいことも明らかとなった。

実施例 7

上皮系細胞をヒト成人包皮由来とした場合の毛包再構成

包茎除去等の術時に得られた成人包皮組織（20歳代）より表皮細胞を調製し、凍結保存マウス毛乳頭細胞調整品と混合し、上述の再構成毛包作製手順によりヌードマウス背部皮膚に移植して毛包再構成の有無を調べた。

成人包皮組織は一般的な線維芽細胞培養用培地（DMEM培地など）及び角化細胞培養培地（ケラチノサイトーSFM培地；インビトロジェン社など）中で冷蔵保存することで、1週間程度保存する

ことができる。

成人包皮組織由来培養細胞の調製方法は実施例 6 の新生児包皮由来培養細胞の調製方法に準じて行うことができる。

上記移植の結果を以下の表 6 に示す。

表 6

毛乳頭細胞 画分	上皮系細胞画分	毛包 再構成	(原基形成数 ／移植数)
マウス	ヒト(成人包皮)	+	(1 / 1)
マウス	ヒト(成人包皮由来培養細胞)	+	(4 / 6)

＋…移植組織内で毛包形成が認められる

この結果から、上皮系細胞として成人ヒト由来のものをマウス毛乳頭と組合わせても毛包の再生に有効であることが判った。このことから、毛包を再生させる系において毛乳頭細胞と組合わせることができる上皮系細胞は、発生過程、成熟した組織に関わらず、利用できることが明らかになった。

実施例 8

ヒト包皮由来培養細胞の継代数による毛包再構成に及ぼす影響

実施例 6 及び 7 において、ヒト新生児あるいは成人包皮由来の異なる人種の上皮細胞を異なる継代数、培養後にマウス毛乳頭と組合わせて、毛包再構成の実験に供した場合の、再構成の効率について、以下の表 7 に示す。

表 7

毛乳頭 細胞	上皮系細胞	人種	継代数	毛包 再構成	(原基形成数 ／移植数)
マウス	ヒト(新生児包皮)	黒人	0	+	(3／3)
マウス	ヒト (新生児包皮由来培養細胞)	黒人	1	+	(2／2)
マウス	ヒト (新生児包皮由来培養細胞)	黒人	2	+	(3／3)
マウス	ヒト (新生児包皮由来培養細胞)	白人	1	+	(1／1)
マウス	ヒト (新生児包皮由来培養細胞)	白人	2	+	(1／4)
マウス	ヒト (新生児包皮由来培養細胞)	白人	3	－	(0／2)
マウス	ヒト (新生児包皮由来培養細胞)	白人	5	－	(0／2)
マウス	ヒト (成人包皮由来培養細胞)	日本人	0	+	(1／1)
マウス	ヒト (成人包皮由来培養細胞)	日本人	1	+	(2／2)
マウス	ヒト (成人包皮由来培養細胞)	日本人	2	+	(2／4)
マウス	ヒト (成人包皮由来培養細胞)	日本人	3	+	(0／1)

＋…移植組織内で毛包形成が認められる

－…移植組織内で毛包形成が認められない

この結果から、上皮系細胞として、人種に関わらず、継代数が若いほど、毛包が再構成されることも明らかとなった。

実施例 9

再構成された毛包の検討

再構成された毛包が毛乳頭細胞と上皮系細胞との組み合わせにより構成されているかどうかを確認するには、例えば種特異的な抗体を用いる方法や種特異的な遺伝子配列（ヒト A l u 配列など）を用いることができる。もっとも簡便には、毛包再生のための本発明に

係る組成物として異種系組成物を使用し（例えば毛乳頭細胞をマウス由来とし、上皮系細胞をラット又はヒト由来とする、又はその逆）、核染色に用いられるヘキスト（Hoechst）#33258試薬（Molecular Probe社）による染色によって、異種系のマウスの場合は核内に複数のドット（点）が明瞭に観察されるのに対し、ヒト、ラットではそれが認められないことで容易に組織学的観察により判別することができる（Miller GJ & Ferrara JA, Stain Technol. 63 (1) : 15-21, 1988）。

ヘキスト#33258 核染色法

移植部位の組織を薄切したパラフィン切片をスライドガラス（4-6 μm が望ましい）に載せ、通常の脱パラフィン処理し（キシレン洗浄2回→99.9%エタノール洗浄→80%エタノール洗浄→70%エタノール洗浄→水洗）、PBS溶液に移した（この状態でしばらく置いておくことができる）。

ヘキスト#33258（モレキュラープローブ社）4mgを1mLのPBS溶液に溶解した（アルミで遮光）。出来上がったヘキスト#33258溶液10 μL を10mLのPBSで希釈し（1000倍希釈、最終濃度4 $\mu\text{g/mL}$ ）、その数滴を平置したスライドの組織切片の上を完全に覆うように添加した。その後、室温で遮光しながら15分反応させ、5分間水洗した後、GVA Mounting Solution（グリセロール系封入剤、Zymed Lab.製、フナコシ薬品扱い）とカバーガラスで封入した。UV領域の励起が観察可能な蛍光顕微鏡の下、観察を行った。

この方法によれば、マウス細胞の核は明るく、複数のドットが観察され、その他のラット、ヒト細胞はドットが見えないので、組織の起源の種を識別できる。

図5は毛乳頭細胞がマウスに由来し、上皮系細胞がヒト（ヒト新生児包皮由来）に由来する毛包再構成系を移植した場合の蛍光顕微

鏡写真の結果を、通常の組織染色、即ちヘマトキシリン－エオジン（HE）染色（「染色法のすべて」医歯薬出版株式会社、p2～7, 1988年）した組織像との対比において示す。その図から、毛包は毛乳頭細胞（マウスに由来する明るいドットを多数有する部分）と上皮系細胞（ヒトに由来するドットを有しない部分）の双方から構成されることが明らかとなった。

実施例 10

3次元皮膚モデルでの毛包原基再生

ヒト線維芽細胞を0.1%コラーゲン溶液/DMEM/10%FBSに適当量分散させ、シャーレに分注し、ただちに37℃のCO₂インキュベータに静置した。ゲル化後、シャーレ壁面および底面よりゲルを剥がし、シャーレの中で浮遊するようにさせた。コラーゲンゲルを揺らしながら培養し、ゲルを約5分の1に収縮させ真皮モデルとした。真皮モデルをステンレスグリッドの上に置き、その上にガラスリングをセットし、KGM（表皮細胞培養用培地）に分散したヒト培養表皮細胞（ 1.0×10^6 細胞数/ml）を0.4 ml ガラスリング内に注入し培養した。このとき、「凍結保存」マウス由来真皮細胞調製品を同時に混合して注入した。シャーレ内にDMEM－KGM－5%FBS＋Ca²⁺の培地を、真皮モデルの上部が空気に晒される程度に入れ、培養し、約一週間後に皮膚モデルを観察し、毛包原基形成の有無と再現性を、ヘマトキシリン－エオジン染色及び上記ヘキスト染色により判定した。その結果を図6に示す。

図6の結果から明らかなおおり、本発明に係る毛包再生系を3次元皮膚モデルに移植しても、毛包原基形成が認められた。

産業上の利用の可能性

本発明に係る毛包を再生するための組成物は毛包移植や、毛包再構成についての研究・開発に利用できる。

請 求 の 範 囲

1. 毛乳頭細胞調製品を調製する方法であって、皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を凍結保存することで毛胞上皮細胞を死滅させることを特徴とする、方法。

2. 前記細胞懸濁物の細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$ に調整してから凍結保存を行う、請求項 1 記載の方法。

3. 前記凍結保存を -80°C 以下の温度で行う、請求項 1 又は 2 記載の方法。

4. 前記凍結保存を液体窒素の中で行う、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

5. 前記凍結保存を 1 週間以上の期間にわたって行う、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

6. 皮膚組織がマウスに由来する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

7. 皮膚組織がラットに由来する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

8. 皮膚組織がヒトに由来する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

9. 毛乳頭細胞及び上皮系細胞を含んで成り、ここで当該毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比が $1 : 10 \sim 10 : 1$ であることを特徴とする、毛包を再生するための組成物。

10. 毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比が約 $1 : 1$ である、請求項 9 記載の組成物。

11. 皮膚組織から表皮組織を取り除くことで得た真皮組織画分をコラーゲン処理して細胞懸濁物を調製し、次いで当該細胞懸濁物を

凍結保存することで毛包上皮細胞を死滅させることで調製された毛乳頭細胞調製品及び上皮系細胞を含んで成り、ここで当該毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比が $1 : 10 \sim 10 : 1$ である、毛包を再生するための組成物。

12. 毛乳頭細胞、対、上皮系細胞の細胞数の比が約 $1 : 1$ である、請求項11記載の組成物。

13. 前記細胞懸濁物の細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8 / \text{ml}$ に調整してから凍結保存を行う、請求項11又は12記載の組成物。

14. 前記凍結保存を -80°C 以下の温度で行う、請求項11～13のいずれか1項記載の組成物。

15. 前記凍結保存を液体窒素の中で行う、請求項11～14のいずれか1項記載の組成物。

16. 前記凍結保存を1週間以上の期間にわたって行う、請求項11～15のいずれか1項記載の組成物。

17. 毛乳頭細胞及び上皮系細胞が共にマウスに由来する、又は共にラットに由来する、又は共にヒトに由来する、請求項9～16のいずれか1項記載の組成物。

18. 毛乳頭細胞及び上皮系細胞が異種細胞であり、各々がマウス、ラット又はヒトに由来する、請求項9～16のいずれか1項記載の組成物。

19. 上皮系細胞がヒト包皮に由来する、請求項9～18のいずれか1項記載の組成物。

20. ヒトに請求項9～19のいずれかに記載の組成物を移植し、毛包を再生する方法。

21. レシピエント動物に請求項9～19のいずれかに記載の組成物を移植し、毛包を再生する方法。

22. レシピエント動物が免疫系の抑制された動物である、請求項

21記載の方法。

23. レシピエント動物がヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットからなる群より選ばれる免疫系が抑制された動物である、請求項21又は22記載の方法。

24. 前記組成物を、毛乳頭細胞が $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個 / cm^2 の移植量で移植されるように移植する、請求項20～23のいずれか1項記載の方法。

25. 前記組成物を、毛乳頭細胞が $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個 / cm^2 の移植量で移植されるように移植する、請求項20～23のいずれか1項記載の方法。

26. 請求項9～19のいずれかに記載の組成物を含む皮膚三次元モデルを作製し、毛包を再生する方法。

27. 毛乳頭細胞を $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個 / cm^2 の量で前記皮膚三次元モデルに含ませる、請求項26記載の方法。

28. 毛乳頭細胞を $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個 / cm^2 の量で前記皮膚三次元モデルに含ませる、請求項26記載の方法。

29. レシピエント動物に請求項9～19のいずれかに記載の組成物を移植し、こうして再構成毛包を担持することになったキメラ動物。

30. レシピエント動物が免疫系の抑制された動物である、請求項29記載のキメラ動物。

31. レシピエント動物がヌードマウス、スキッドマウス、ヌードラットからなる群より選ばれる免疫系が抑制された動物である、請求項29又は30記載のキメラ動物。

32. 前記組成物を、毛乳頭細胞が $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個 / cm^2 の移植量で移植されるように移植した、請求項29～31のいずれか1項記載のキメラ動物。

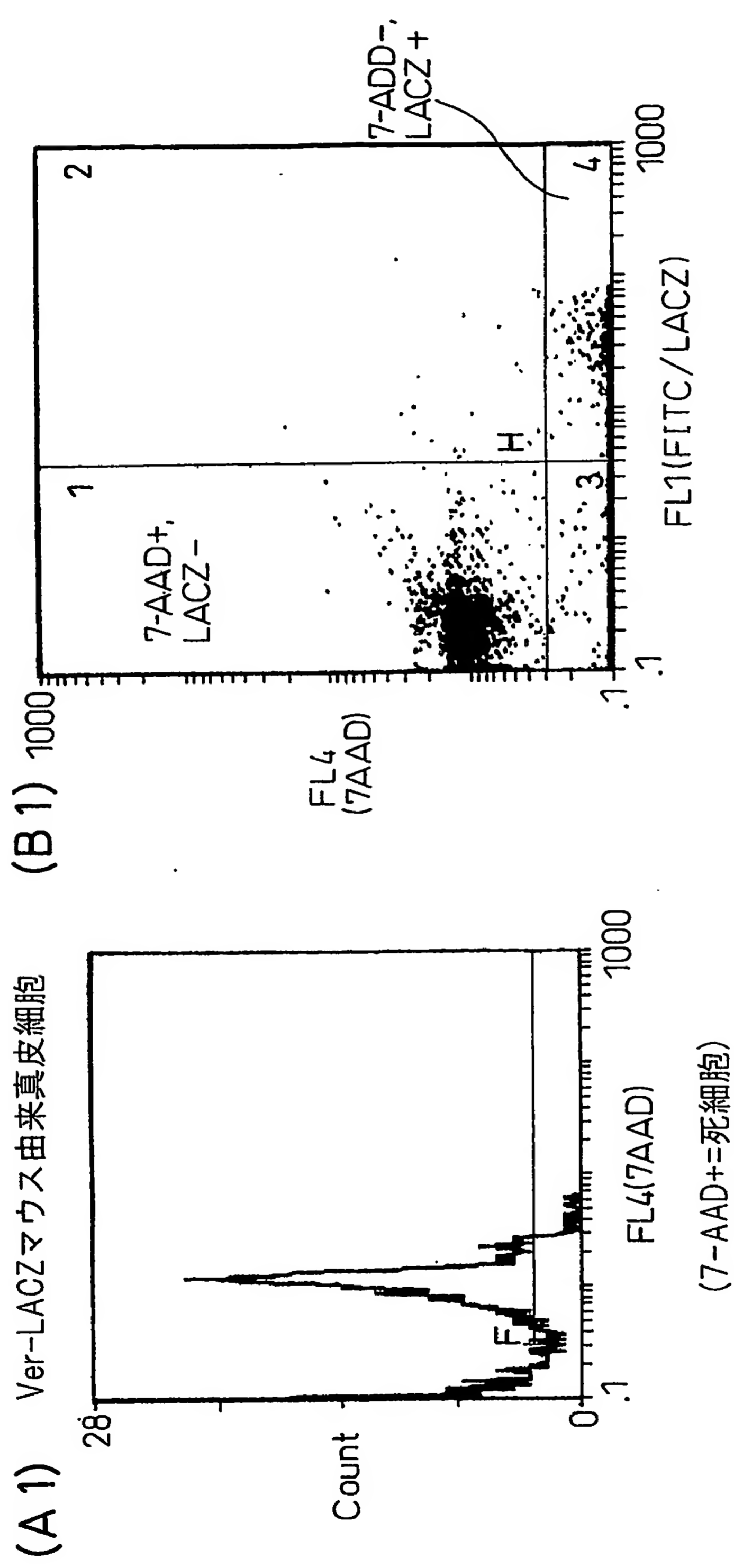
33. 前記組成物を、毛乳頭細胞が $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個 / cm^2 の移植量で移植されるように移植した、請求項29～31のいずれか1項記載のキメラ動物。

34. 請求項9～19のいずれかに記載の組成物を含む皮膚三次元モデルを作製し、こうして再構成毛包を担持することになった皮膚三次元モデル。

35. 毛乳頭細胞を $1 \times 10^6 \sim 10^8$ 個 / cm^2 の量で含む、請求項34記載の皮膚三次元モデル。

36. 毛乳頭細胞を $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個 / cm^2 の量で含む、請求項34記載の皮膚三次元モデル。

Fig. 1



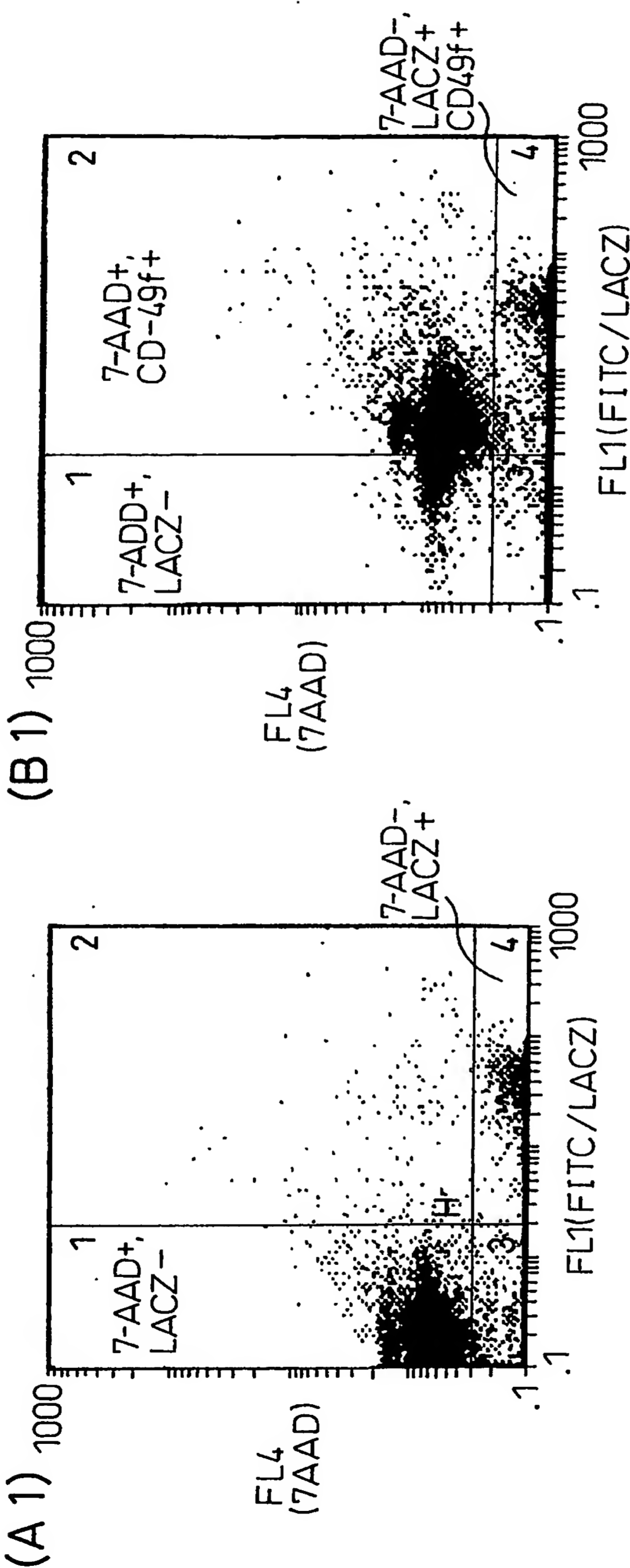
(A2)

Hist	Region	ID	%
3	D	LACZ+	34.0
5	F	7AAD+	34.4

(B2)

Hist	Region	ID	%
7	H1	FL1-FL4(7-AAD+,LACZ-)	33.6
	H2	FL1-FL4	0.92
	H3	FL1-FL4	31.6
	H4	FL1-FL4(7-AAD-,LACZ+)	33.9

Fig.2



(A2)

7AAD標識

Region ID	%
D LACZ+	37.5
F 7AAD+	39.5
H1 FL1-FL4(7-AAD+,LACZ-)	37.3
H2 FL1-FL4	2.40
H3 FL1-FL4	25.1
H4 FL1-FL4(7-AAD-,LACZ+)	35.2

(B2)

7AAD標識+CD49f-FITC標識

Region ID	%
D LACZ+/CD49f	74.2
F 7AAD+	43.5
H1 FL1-FL4(7-AAD+,LACZ-,CD49f-)	10.6
H2 FL1-FL4(7-AAD+,CD49f+)	33.0
H3 FL1-FL4(7-AAD-,LACZ-,CD49f-)	14.5
H4 FL1-FL4(7-AAD-,LACZ+)	41.9

Fig.3

移植4週間後



上皮系細胞＋凍結毛乳頭細胞

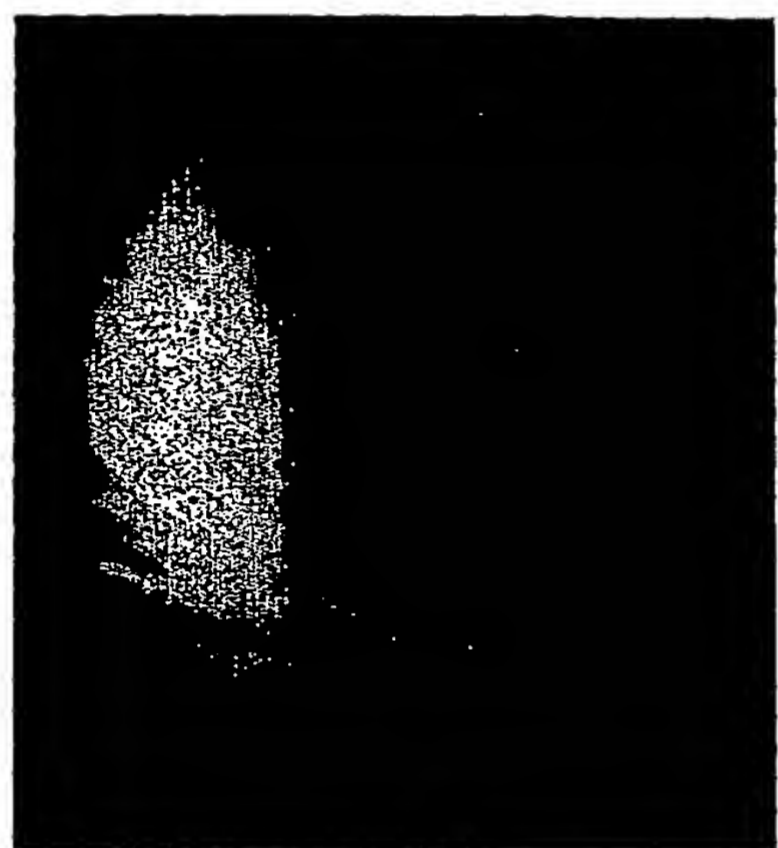


上皮系細胞のみ



凍結毛乳頭細胞のみ

Fig.4



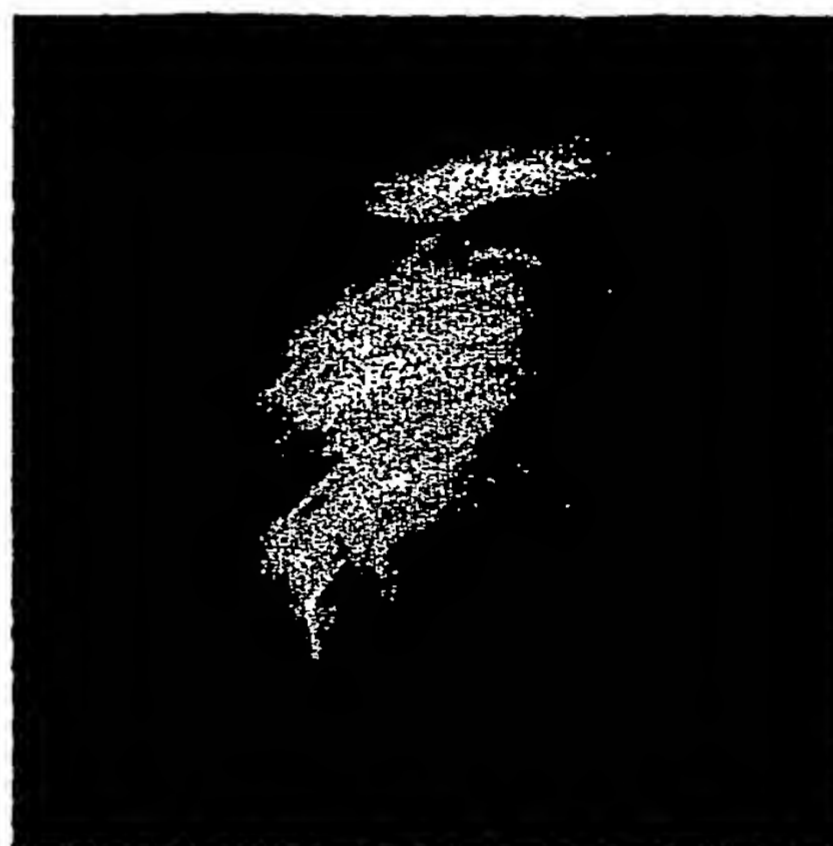
マウス
ラット



ラット
ラット

毛乳頭細胞
上皮系細胞

4/6



マウス
マウス



ラット
マウス

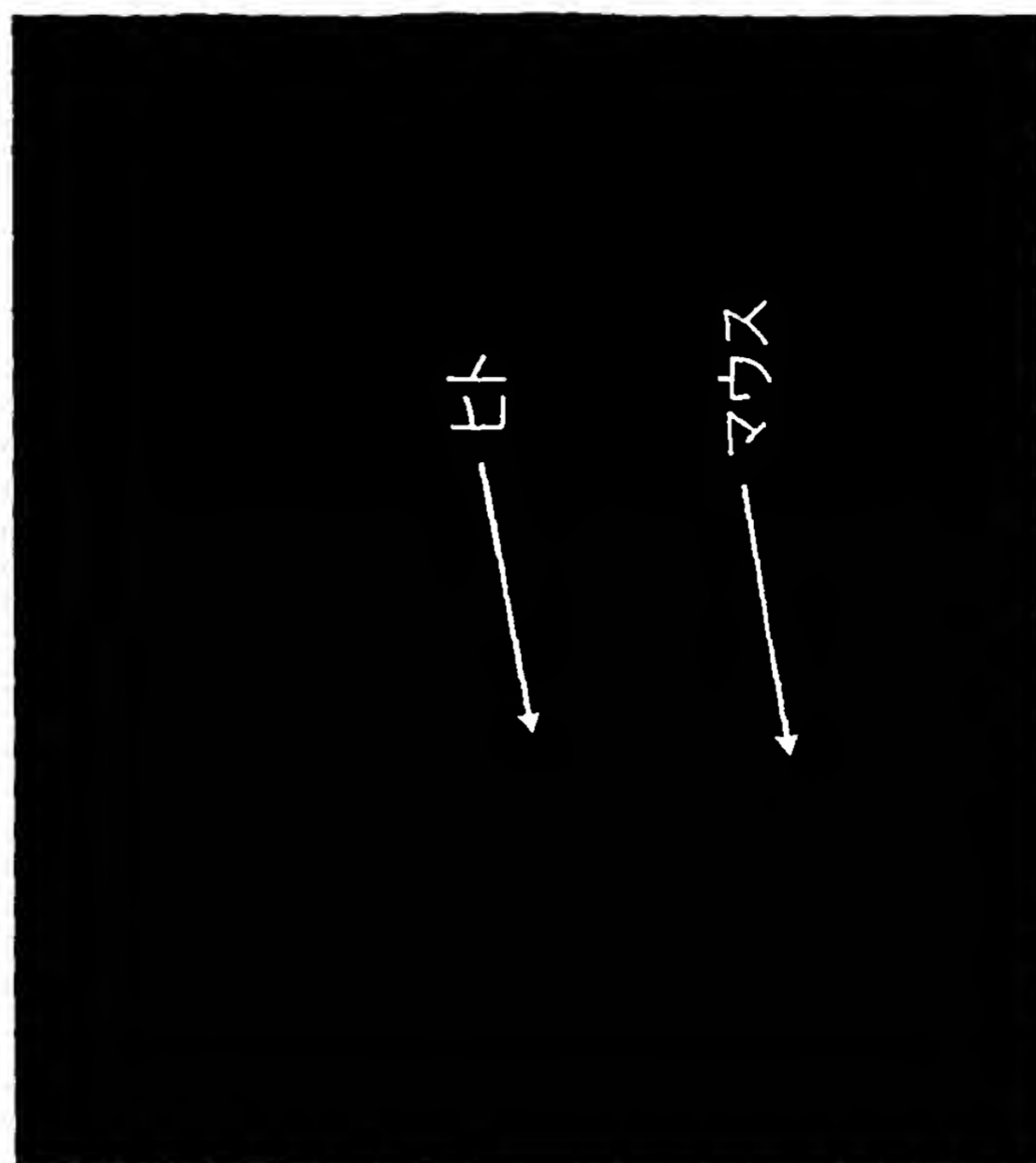
毛乳頭細胞
上皮系細胞

4wks

Fig.5

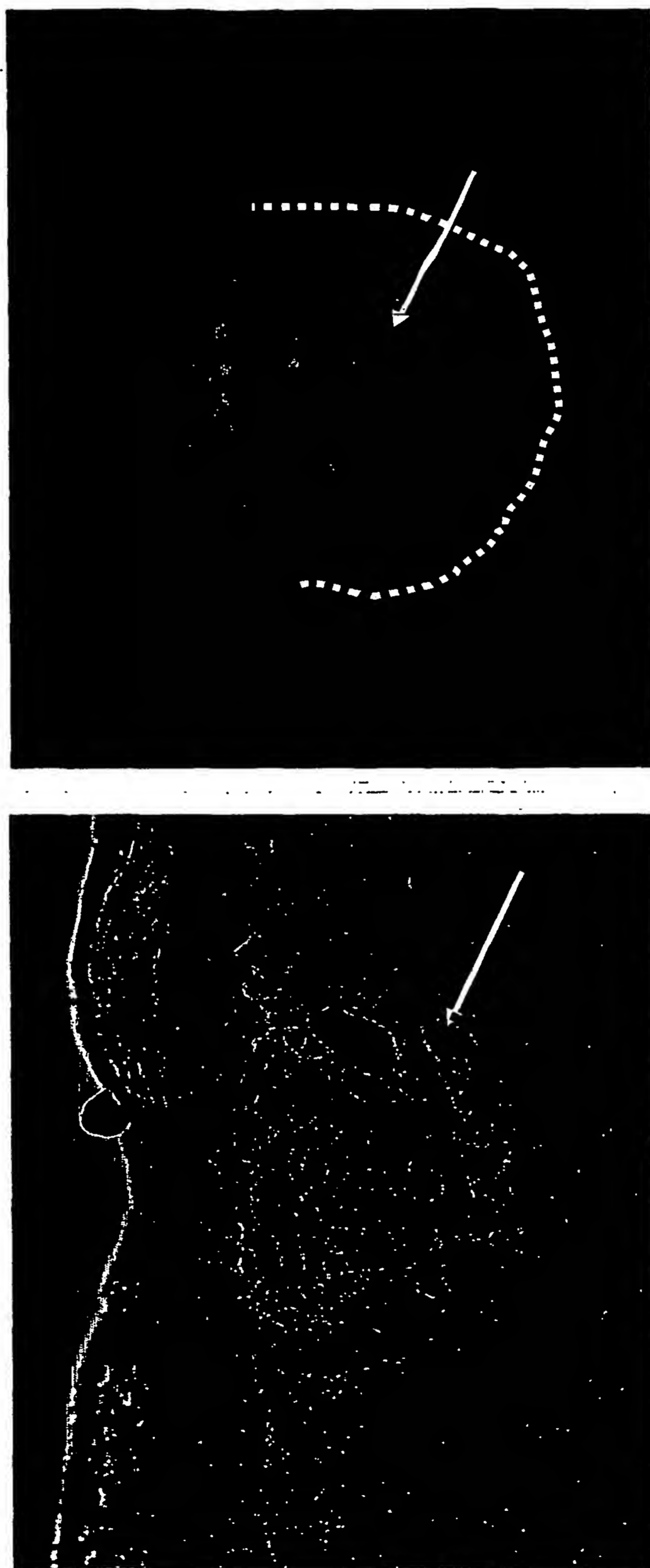


組織像



ヘキスト核染色

Fig.6



ヒト繊維芽細胞
+ ヒト上皮系細胞
+ マウス毛乳頭細胞画分

ヘキスト核染色

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/08, A01K67/027, A61K35/36, A61P17/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/08, A01K67/027, A61K35/36, A61P17/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, WPI (DIALOG), PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Ritsuko EHAMA et al., "Hito Yurai Saibo ni yoru Chimera Moho Saikosei no Kokoromi", The Molecular Biology Society of Japan Nenkai (2003-November), Vol.26, page 764, 2PC-024	1-19, 23, 26-36
X	Jiro KISHIMOTO, "Mohatsu no Kagaku: Yomigaeru Fushigi", Nippon Nogei Kagaku Kaishi (2003-June), Vol.77, No.6, pages 566 to 569, page 14, right column	9-18, 23, 26-36
A		1-8, 19
A	Jiro KISHIMOTO, "Johi· Hifu Saisei no Kiso to Rinsho Moho no Saisei", Gekkan Medical Science Digest (2002), Vol.28, No.14, pages 561 to 564	1-19, 23, 26-36
A	Mutsumi INAMATSU et al., "Monyuto Saibo o Mochiita Mohatsu Saisei", Saisei Iryo (2002), Vol.2, No.3, pages 114 to 119	1-19, 23, 26-36

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 December, 2004 (16.12.04)

Date of mailing of the international search report
11 January, 2005 (11.01.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014779

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tomoyo TACHINO et al., "Zoki Saisei to Kansaibo Seibutsugaku Hifu to Kanzo no Saisei", Iden Bessatsu (2001), No.13, pages 53 to 61	1-19, 23, 26-36
A	WO 2001/070021 A1 (Menicon Co., Ltd.), 27 September, 2001 (27.09.01), & AU 200136053 A & EP 1269840 A1 & KR 2002086678 A & CN 1419410 A & US 2003/0118982 A1	1-19, 23, 26-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014779

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20-22, 24-25

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 20 to 22, 24 to 25 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (continued to extra sheet.)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014779

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N5/08, A01K67/027, A61K35/36, A61P17/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N5/08, A01K67/027, A61K35/36, A61P17/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, WPI(DIALOG), PUBMED

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	江浜律子 他, ヒト由来細胞によるキメラ毛包再構成の試み, 日本分子生物学会年会 (2003-Nov), Vol. 26, p. 764 2PC-024参照	1-19, 23, 26-36
<u>X</u> A	岸本治郎, 毛髪科学: 蘇る不思議, 日本農芸化学会誌 (2003-Jun), Vol. 77, No. 6, p. 566-569 14頁右欄	9-18, 23, 26-36 1-8, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.12.2004

国際調査報告の発送日

11.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	岸本治郎, 上皮・皮膚再生の基礎と臨床 毛包の再生, 月刊メディカル・サイエンス・ダイジェスト (2002), Vol. 28, No. 14, p. 561-564	1-19, 23, 26-36
A	稲松睦 他, 毛乳頭細胞を用いた毛髪再生, 再生医療 (2002), Vol. 2, No. 3, p. 114-119	1-19, 23, 26-36
A	立野知世 他, 臓器再生と幹細胞生物学 皮膚と肝臓の再生, 遺伝 別冊 (2001), No. 13, p. 53-61	1-19, 23, 26-36
A	WO 2001/070021 A1 (株式会社メニコン) 2001. 09. 27 &AU 200136053 A &EP 1269840 A1 &KR 2002086678 A &CN 1419410 A &US 2003/0118982 A1	1-19, 23, 26-36

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-22, 24-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 20-22, 24-25に係る発明は、人間の手術方法又は治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(i v)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.